

審査の結果の要旨

氏名 中山 丈史

経口投与は低侵襲性や簡便性等の利点から広く使用される投与経路である。経口投与された医薬品が循環血中に達するためには、まず消化管において溶解・吸収される必要がある。そのため、医薬品の消化管吸収機構の解明は、創薬過程における医薬品候補化合物の最適化、薬効や副作用の個人間変動の一要因を理解する上で必須である。消化管上皮細胞には管腔側膜および血管側膜上に様々なトランスポーターが発現しており、いくつかのトランスポーター分子については、基質薬物の消化管吸収を促進・抑制しうるものが、近年の研究から明らかになってきている。また、トランスポーター遺伝子の多型や阻害薬の併用等が、基質薬物の消化管吸収の変動を引き起こす、との知見が複数報告されている。消化管上皮細胞の管腔側膜上には、P-glycoprotein (P-gp)や breast cancer resistance protein (BCRP)などの排出トランスポーター群について、基質薬物の消化管吸収を抑制する働きを持つ。また、管腔側膜からの基質薬物の取り込みを担うトランスポーター群については、機能的な意義の実証には未だ至っていないものの、その候補となりうるトランスポーターに関する解析が多数報告されている。その一方で、血管側膜における薬物輸送におけるトランスポーターの関与については情報が極めて少なく、multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3)については methotrexate などごく一部の薬物についての報告を除くと、分子実態はほぼ未知である。

申請者である中山は、本研究において、消化管上皮細胞の血管側膜に発現する胆汁酸トランスポーターである organic solute transporter α/β (OST α/β)が、医薬品の消化管吸収に占める重要性の解明に取り組んだ。本論文では、申請者らがこれまでに見出した OST α/β の基質薬物の中から比較的輸送活性が高い複数の薬物を選択し、基質薬物の消化管膜透過に対する OST α/β の関与を、Osta-knockout (KO)マウス由来の消化管組織を用いた *in vitro* 試験系により検討した。また、Osta-KO マウスを用いた *in situ* 消化管灌流試験および *in vivo* 体内動態試験により、実際の生体内における基質薬物の消化管吸収に対する OST α/β の寄与の解析を行った。これらの検討を通じ、医薬品の *in vivo* 消化管吸収において、OST α/β が寄与しうる事例を初めて見出した。学位論文は2章で構成されており、第1章では主に、*in vitro* での結果を、第2章では *in situ* および *in vivo* での結果に基づいた考察を展開している。

第1章 薬物の消化管膜透過性に対する OST α/β の寄与の検討1-1. 薬物のマウス消化管膜透過に対する OST α/β の関与の解析

申請者は、OST α/β 過剰発現細胞系において、良好な基質を複数同定した。飽和性を検討した結果、いずれも低親和性の基質であった。ヒトとマウス OST α/β 輸送活性には、明確な基質選択性が認められなかった。野生型および Osta-KO マウス由来の回腸部における吸収方向の透過性を、消化管検体を介した吸収/分泌方向の物質の透過性を定量的に評価可能な Ussing chamber 法を用いて検討した。その結果、sulfasalazine や trichlormethiazide など複数の

基質薬物について、Osta-KO マウス由来の回腸検体において吸収方向の透過性が有意に低下したことから、回腸部において Osta β が基質薬物の消化管吸収方向の透過に寄与していることが示唆された。刷子縁膜側からの取り込みについては、Oatp1a5 を想定し、実際にいくつかの薬物は Oatp1a5 基質となることが確認されたが、回腸部における透過性は Oatp1a5 阻害剤の影響が認められなかった。

第2章 薬物の経口吸収に対する OST α/β の寄与の検討

2-1. 消化管灌流法を用いた、薬物のマウス消化管吸収における OST α/β の寄与の解析

野生型および Osta-KO マウスの回腸部の管腔内を、OST α/β 基質薬物を含む緩衝液で灌流し、循環血漿中の薬物濃度の時間推移および灌流最終時点での回腸組織内濃度を測定した。その結果、Ussing chamber 法で吸収方向の透過性の低下が見られた sulfasalazine や trichlormethiazide など複数の薬物において、血漿中濃度が Osta-KO マウスで有意に低値を示した。一方、これら薬物をマウスに静脈内定速投与した時には、野生型と Osta-KO マウスの間で有意な差が認められなかったことから、灌流試験で見られた血漿中濃度の低下は、回腸部からの吸収の低下によるものと示唆された。また、小腸組織内から血管側への排出能力の指標として、最終時点における血漿中濃度を回腸組織内濃度で除した値を算出したところ、野生型に比べて Osta-KO マウスで有意に低値となったことから、回腸部における吸収の低下は、血管側膜の透過の低下に起因すると考えられ、Osta β による輸送の消失が原因となっていることが強く示唆された。

2-2. 薬物のマウス経口吸収における OST α/β の寄与の解析

野生型および Osta-KO マウスに OST α/β 基質薬物を経口投与後、血漿中濃度推移を測定し、in vivo 経口吸収における OST α/β の関与の検討を行った。その結果、trichlormethiazide の血漿中濃度は Osta-KO マウスにおいて有意に低下し、血漿中 AUC_{0-∞} は 47.7% 低下した。これにより、OST α/β が基質薬物の in vivo 経口吸収に関与していることを初めて実証した。一方で、in vitro や in situ 実験で吸収方向の透過性の低下が認められた fluvastatin や sulfasalazine の血漿中濃度は、Osta-KO マウスにおいて低下が観察されなかった。

2-3. マウスの消化管部位別の薬物吸収性の検討

In vitro 試験および in situ 試験において、薬物の吸収方向の透過性に対する OST α/β の関与が示唆されたものの、経口投与時に Osta-KO マウスにおいて血漿中濃度の低下が見られなかった薬物に関して、経口投与後、消化管上部で吸収される割合が大きく、回腸に至る前に吸収の大部分が終わっている可能性を考えた。そのことを検証するため、野生型マウスの十二指腸部および回腸部を用いて OST α/β 基質薬物の灌流試験を行い、循環血漿中濃度の時間推移を測定した。その結果、in vivo 経口吸収が Osta-KO マウスで低下しなかった fluvastatin の吸収性は、消化管下部（回腸）に比べて上部（十二指腸）で有意に大きいことを明らかに

した。Osta-KO マウスで経口吸収の低下が見られた trichlormethiazide については、消化管上部と下部で吸収性に有意な差は認められず、また、sulfasalazine についてはむしろ消化管下部での吸収性が高いことが明らかとなった。これらにより、少なくとも fluvastatin の経口吸収が Osta-KO マウスで低下しなかった要因の一つとして、消化管吸収率が良好であり、消化管上部で大半の吸収が終わっている可能性が示唆された。

2-4. MRP3 発現ベシクルを用いた薬物輸送試験

申請者は、OST α/β の良好な基質でありながらも、消化管膜透過における OST α/β の寄与が見られない薬物について、OST α/β と同じく消化管上皮細胞の血管側膜での発現が認められる MRP3 との相対的な寄与の相違を考慮し、OST α/β 基質薬物について、human MRP3 発現ベシクルを用いた薬物輸送試験を行い、基質認識性を確認した。その結果、Osta-KO マウスで回腸部での透過に差が認められなかった pravastatin や atenolol など複数の薬物が MRP3 基質となる一方、trichlormethiazide などは MRP3 基質とならないことを明らかにした。

以上のように、申請者はマウスにおいて OST α/β が基質薬物の *in vivo* 消化管吸収に寄与しうることを初めて明らかにした。OST α/β はこれまでの研究により、消化管において内因性基質である胆汁酸の再吸収を担う重要なトランスポーターであることが知られていたが、本研究により、医薬品の消化管吸収にも関与しうる事例があるという新たな知見を得た。また、基質薬物の *in vivo* 消化管吸収に対する OST α/β の寄与が限定的であった要因の一つとして、fluvastatin に関しては、消化管吸収全体における下部での吸収量の割合が小さいことを示唆する知見を得ている。さらに、OST α/β 基質薬物の内、複数の薬物については、OST α/β と同様に消化管上皮細胞の血管側膜上に発現する MRP3 の基質となることが明らかとなり、MRP3 による輸送の相対的な寄与の大きさが OST α/β の寄与を決定する要因の一つとなることも示唆している。これらの知見は、医薬品の消化管吸収に関与しうるトランスポーターとして新たに OST α/β を見出すのみならず、薬物の消化管吸収における OST α/β の重要性を決定する複数の要因を提唱すると共に、現在情報が極めて限られている薬物の血管側膜の透過におけるトランスポーターの重要性の理解へとつながるものと期待される。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。